Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューションと Agilent Easy Access ソフトウェアを使用したウォークアップ方式の LC システム

最大 8 本のカラムが使用可能な LC システムを用いた反応過程のチェック、最適なカラムの探索、および不純物のチェック

アプリケーション

薬品開発

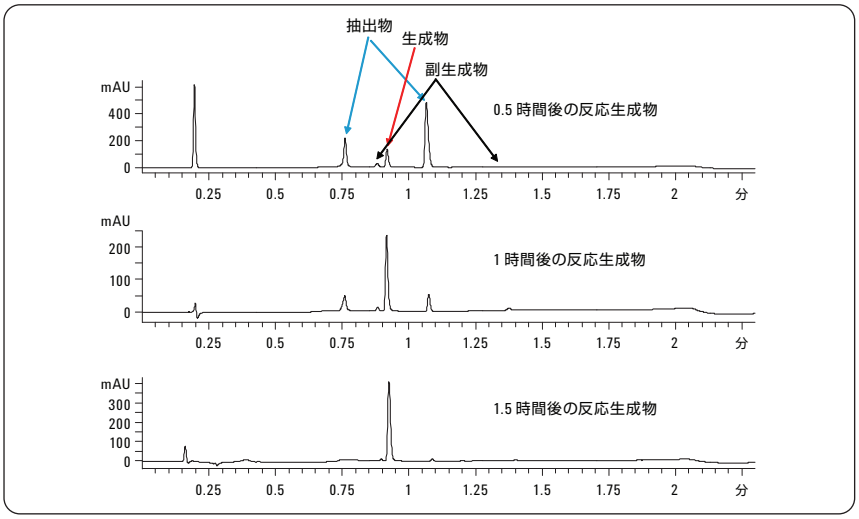
著者

Angelika Gratzfeld-Hüsgen

Michael Frank

Agilent Technologies

Waldbronn, Germany



概要

化学合成ラボでは、新規化合物の合成にさまざまなユーザーが関わっています。ユーザーグループや単独ユーザーによって複数のプロジェクトが進められているのが普通です。液体クロマトグラフィーと質量分析計を組み合わせたシステムは次のようなニーズや分析タスクに対応しなければなりません。

- 適時な反応モニタリング
- 反応生成物のコントロール
- 分取 LC 前の最適なカラムの探索
- 分取 LC 後の純度分析
- 稼働中の LC システムへの容易なアクセス
- さまざまな選択性のカラムが利用できること
- すぐに使えるクロマトグラフィーメソッドが用意されていること
- サンプルの分析が完了したらすぐに結果が報告されること

Agilent Technologies

はじめに

化学合成ラボの主な仕事は、一定の要件を満たす新たな化合物 (新たな薬品化合物/農薬/染料など) を作り出すことです。一般的に、期待される構造に達するためにはいくつもの試みが必要であり、また、多くの場合、数回にわたる構造の修正が必要になります。個々の化合物合成には、反応のモニタリング、反応生成物のコントロール、分取 LC で精製した化合物の純度チェックという作業が伴います。従来、こうした作業の多くは薄層クロマトグラフィによって行われてきました。しかし、高速な LC/MS システムによって、より短期間のうちに、また最も重要な点としては、はるかに精密な情報を得ながら成果をあげられるようになりました。多くの企業で LCMS システムを利用できるようになってきた理由はここにあります。

こうした環境下で最近使用されているのがウォークアップ方式の LC/MS システムです。これは、経験の浅いユーザーでも簡単に使用できるシステムであり、分析者が持参したサンプルをあらかじめ用意されたカラムやクロマトグラフィーメソッドによって分析する機能や、分析完了時に (E メールなどによって) 結果を報告する機能を備えています。多くの場合、経験の浅いユーザーは LC/MS システムの使用に慣れていません。このため、スーパーユーザーが、LC/MS システムの運用を管理し、クロマトグラフィーメソッドの提供や LC/MS システムの稼働、エラー発生時のシステムの再起動などを行っています。

複数のプロジェクトは並行して進められるというのが一般的です。したがって、さまざまなユーザーグループや単独ユーザーが稼働中の LC システムにアクセスできなければなりません。最も重要なことは、プロジェクトごとに扱う化合物の特性が異なるため、必要とされる分離の選択性もプロジェクトごとに異なってくるということです。

こうした作業のすべてが、Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューションと Agilent Easy Access ソフトウェアによって実行できます。この LC システムでは、長さや内径の異なるカラムを最大 8 本まで使用できます。スーパーユーザーは、適切な平衡化メソッドを含めて、取り付けられたカラムごとに分析メソッドを定義できます。また、スーパーユーザーは、ユーザーグループや単独ユーザーごとにプロジェクトを定義することもできます。パーミッションレベルは、ユーザーやグループごとに設定できます。優先順位も設定できます。たとえば、反応モニタリングサンプルに最も高い優先順位を与えることによって、これらのサンプルは直ちに分析を実行するということが可能になります。分析が完了すると、該当するユーザーに E メールで結果を報告することが可能となります。

本アプリケーションでは、次のようなラボ環境において、Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューションと Agilent 6140 シングル四重極 MS に Easy Access ソフトウェアを組み合わせて使用しました。

- 3 つのユーザーグループが 同じ LC/MS システムを使用しなければならない
- 4 件の異なるプロジェクトが同時進行している

すべてのグループに次のような分析タスクがあります。

- 反応のモニタリング
- 反応生成物の MS 同定
- 分取精製に最適なカラムを見つけ出すことを目的とした反応混合物分析のためのカラムの探索
- 分取 LC 後の純度管理

実験方法

機器

改定バージョン A.06.10 以降のファームウェアが適用された以下のモジュールから構成される Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC システム。

Agilent 1200 シリーズバイナリポンプ SL (デガッサ装備)

Agilent 1200 シリーズ高性能オートサンプラ SL Plus

2 基の Agilent カラムコンパートメント SL Plus (バルブドライブ内臓)

メソッド開発用バルブキット (G4230B): 高圧条件向けメソッド開発用キャピラリキット、低分散 (ショートカラム用)

Agilent 1200 シリーズダイオードアレイ検出器 (DAD) SL

Agilent 6140 シングル四重極 MS (マルチモードイオン源搭載)

Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Throughput (RRHT) の 1.8 µm カラム数本

Agilent ChemStation B04.01 および Agilent Easy Access ソフトウェア

結果と考察

LC/MS システムの説明

Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューションは、Agilent 1200 シリーズの標準 LC または RRLC システムに 2 基または 3 基のカラムコンパートメント SL Plus を搭載したものです。[1] 1 基目のカラムコンパートメントは、ポンプに接続されたバルブを装備し、それぞれのカラムへ移動相を送り込むようになっています。2 基目のカラムコンパートメントは、検出器に接続されたバルブを備え、現在分析で使用しているカラムから検出器へ移動相を送り込みます。2 基のカラムコンパートメントには、低分散熱交換器を使用して、最長 100 mm のカラムを最大 8 本まで取り付けることができます (図1)。

このシステムでは、ポンプ流路に溶媒切り替えバルブを増設できます。これにより、最大 15種類の異なる溶媒を使い分けられるようになります。2 基のカラムコンパートメントにより、4 つの独立した加熱ゾーンが確保できます。この結果、異なる温度設定のカラムを使用できるようになり、たとえば、特殊な用途に合わせて温度を上げる必要があるときなどに効果を発揮します。

Easy Access ソフトウェアの説明

Agilent Easy Access ソフトウェアにより、ユーザーはサンプルの情報を入力し、メソッドをリストから選択し、システムの指示に従ってサンプルの配置をすれば、あとは自分のラボに戻って E メールでの結果報告を待つだけという「ウォークアップ」方式で処理を実行できます。[2、3]

各ユーザーは、それぞれの許可レベルに応じて、所定のメソッド (たとえば、注入量や注入回数など) を一定の許容範囲内で変更することができます。

システムの構成および管理は、他のすべてのユーザーに代わってシステムの運用管理にあたるスーパーユーザーによって行われます。

用例

本アプリケーションノートの実験で使用したシステムは、固定相の異なる 50 × 2.1 mm のショートカラム 4 本と以下のカラムを装備したものです。
– 100 × 2.1 mm のカラム 1 本
– 150 x 2.1 mm のカラム 1 本
すべてのカラムに 1.8 µm の粒子径の充填剤を使用しました。

スーパーユーザーによる構成および管理

ChemStation ソフトウェアで各カラムの分析メソッドを設定しました。この設定作業は、スーパーユーザーが行わなければなりません。スーパーユーザー以外のユーザーには図 2 の画面へのアクセス権限がありません。Easy Access ソフトウェアのメソッド設定画面では、ChemStation のメソッドを CS メソッドとして使用します (図2)。使用するエンドユーザーの利便性を考慮して、Easy Access メソッドには、そのメソッドの用途が推測しやすくなるような名前を付けます (この例では、「fast kinetic」という名前を付けました)。グラジエントに関する情報を [Description] セクションに入力します。[CS Equil. Method] には、カラムの平衡化メソッドを指定します。この実験では、分析実行にも使用されるクロマトグラフィーメソッドを使用して各カラムを平衡化しました。これにより、そのカラムで実際のグラジエントをすでに一度目にしていることになるため、直前の分析からカラムに残留しているピークがあったとしても実際のクロマトグラムに歪みが生じないように対処できます。しかし、カラムの平衡化には、同じカラムで他の事前定義メソッドを使用することもできます。平衡化メソッドは、分析メソッドが変更されたときにだけ実行されます。

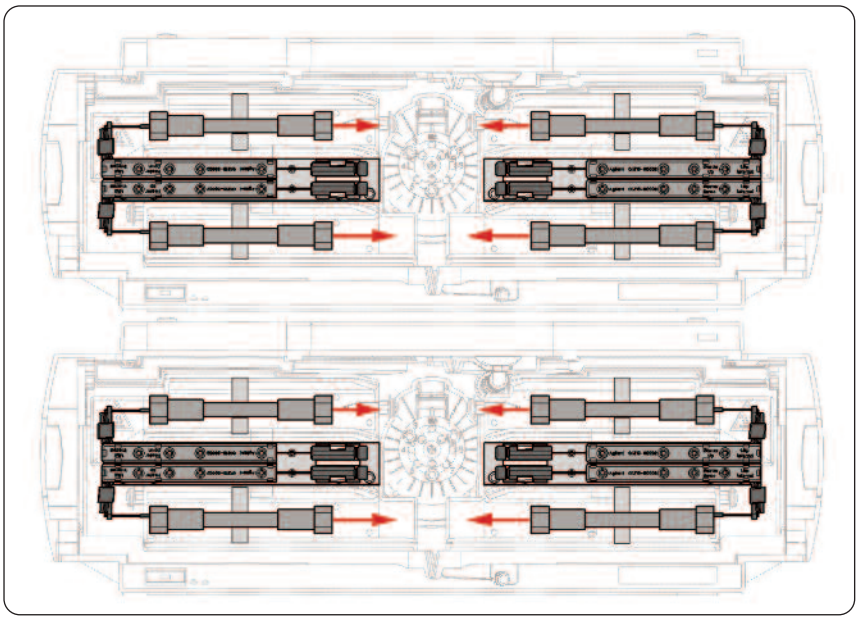


図 1
Agilent 1200 シリーズのカラムコンパートメント SL Plus (最大 8 本のカラムを装着可能)

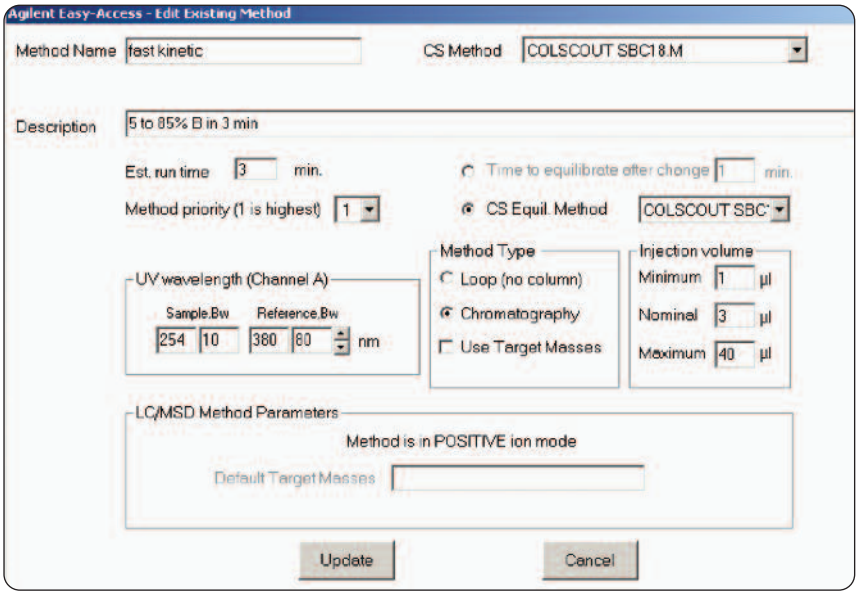


図 2
スーパーユーザーがクロマトグラフパラメータを設定する Agilent Easy Access ソフトウェアの画面

必要な入力をすべて終えたら、Easy Access ソフトウェアのメソッド設定画面を終了します。次の画面では、スーパーユーザーが、このシステムへのアクセス権を与えるユーザーグループやユーザーを定義し、メソッドや他のパラメータの変更に関する権限レベルを指定しなければなりません。

システムの構成が完了すれば、ユーザーは、画面に入ってサンプルを提出できるようになります。各ユーザーは、それぞれの権限に応じて、必要な情報を入力し、メソッドの選択や変更を行い、システムに指示された位置に 1 つまたは複数のバイアルをセットして戻ります (図 3)。

グループ 1 が分取精製作業用のサンプルを提出

グループ 1 の化学者が、カラムの探索に使用するサンプルを提出しています。この化学者は、そのサンプルの分取精製に最適なカラムを選定するために、選択性の異なる 4 種類のカラムを選択しました。持参したバイアルをバイアルトレイに置いて分析を開始すると、選択した各カラムを使用した分析が適切な平衡化および実行パラメータに従って実行されます。最後に、それぞれの実行結果に関するレポートがユーザーに送られます。ユーザーは、そのレポートからどのカラムが最適であるかを決定できます (図 4)。

クロマトグラフィー条件

カラム: 内径 2.1 mm × 50 mm、1.8 µm、ZORBAX SB-C18、ZORBAX SB-CN、ZORBAX Bonus RP-C18、ZORBAX Eclipse PhenylHexyl

グラジエント: 0.8 分間で 5～85 %B まで、1.5 分まで 85 %B に保持、2.4 分までに 5 %B で再平衡化 (流量は 0.8 mL/min)

DAD および MS 検出

この例では、メインピークの前後の分離能が他の 3 つのカラムよりも優れていることから、Agilent ZORBAX SB-C18 カラムが分取分析に最適なものと判断できます。分取分析には同じカラムが選択され、内径 21.2 mm × 150 mm の ZORBAX SB-C18、5 µm、PrepHT 870150-902 が使用されています。分取用 LC/MS システムも、Agilent Easy Access ソフトウェアで管理するウォークアップシステムとして運用されます。

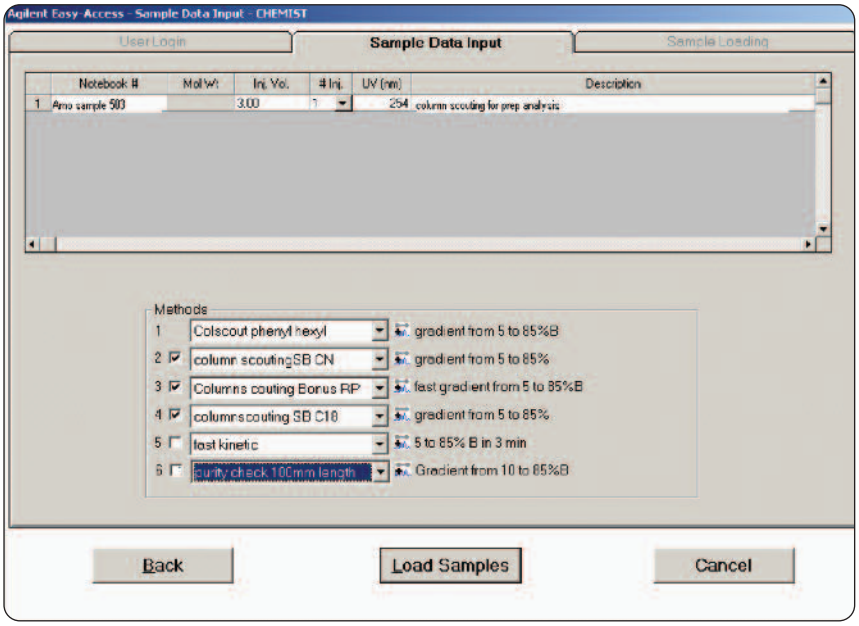


図 3
ユーザー「Arno」がカラムの探索に使用するサンプルを提出

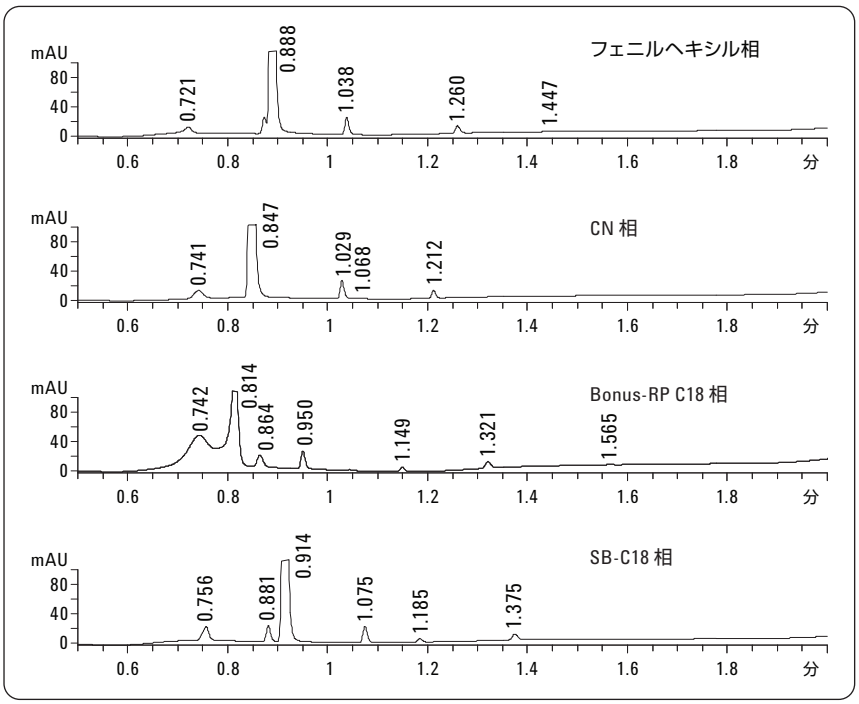


図 4
最適な分取条件の特定を目的とした最適なカラムの探索

分取精製後

化合物を精製して溶媒を蒸発させたあとに残った物質がグループ 1 の別のユーザーによって提出され、150 mm の長さのカラムで分析されました。これは、残った物質の純度が高いかどうか、つまり、溶媒の蒸発時に熱分解が発生しなかったかどうか、もし純度が高くなかった場合にはどの程度の不純物が含まれているかを可能な限り正確に調べるために行います。

図 5 の左側の部分にはサンプルプレートが表示され、バイアルの入っている場所が示されます。右側には、分析の完了したサンプルと順番待ちのサンプルが一覧表示されます。この例では、純度チェック用のサンプルが次の注入サンプルになります。この画面の一番上には、残りの分析が完了するまでの予想所要時間が表示されます。これにより、いつ分析結果が出るかを予測できるようになります。分析が完了すると、ユーザーに E メールで結果が報告されます。

残っていた物質は、分析評価に回すことのできる十分な純度であることが分かりました (図 6)。

クロマトグラフィー条件

カラム: 内径 2.1 mm x 150 mm の ZORBAX SB-C18、1.8 µm
グラジエント: 8 分間で 10～85 %B まで、9 分まで 85 %B に保持、11 分まで 10 %Bで再平衡化
流量: 0.3 mL/min
DAD および MS 検出

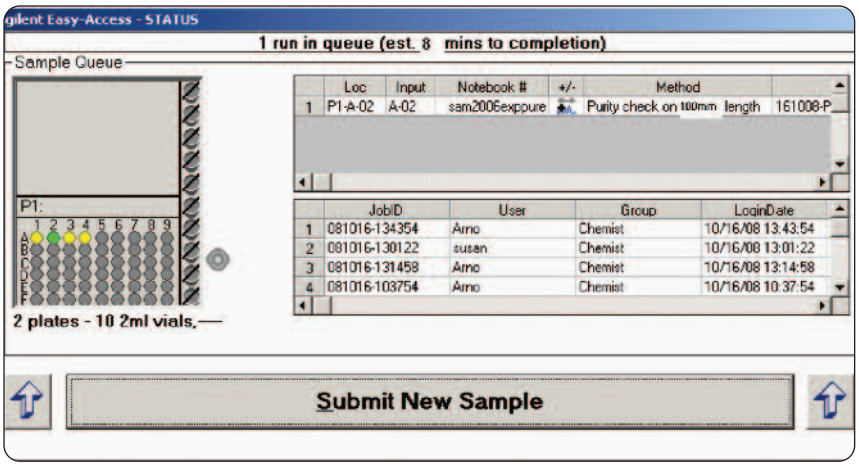


図 5
Agilent Easy Access ソフトウェアのモニタリング画面

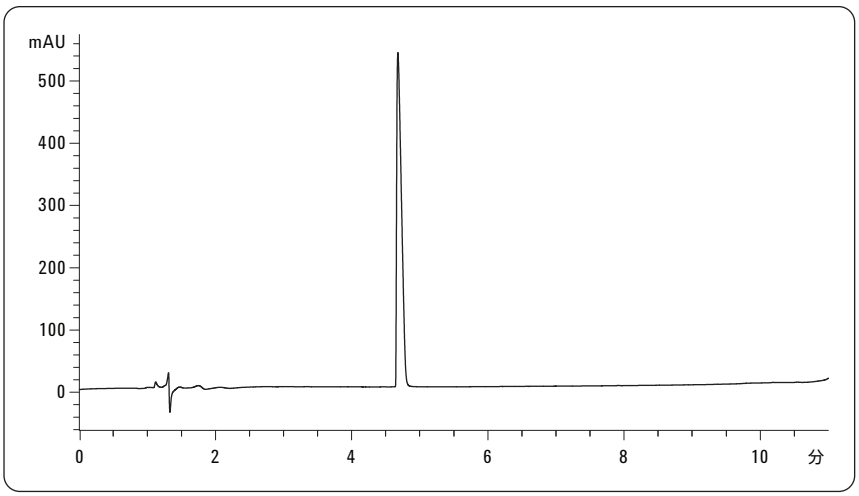


図 6分
取精製後の純度チェック

グループ 2 が反応モニタリング用のサンプルを提出

この間、グループ 2 の化学者が反応をモニタリングするためのサンプルをいくつか提出し、1.5 時間で実行を完了しています。すぐに結果が得られるように、当該の各サンプルは最も高い優先順位で実行されました。[Fast Kinetics] メソッドを選択すると、当該の各サンプルが最優先され、前の実行が終了すると直ちに分析が開始されます。反応キネティックスの測定結果を図 7 に示します。

クロマトグラフィー条件

カラム: 内径 2.1 mm × 50 mm の ZORBAX SB-C18
グラジエント: 1.5 分間で 5〜95 %B まで、2.5 分まで 95 %B に保持、3.6 分まで5 %B で再平衡化
流量: 0.8 mL/min
DAD および MS 検出

期待通りの生成物が得られているかどうかを観察すると同時に、副生成物の分子量もおおまかに把握しておくという目的から、UV クロマトグラムだけでなく、スキャンモードにおける MS シグナルも利用されました。図 8 は質量スペクトルの解析結果をまとめたものです。

目的の生成物は、高い収率 (歩留まり) で 1.5 時間以内に形成されました。構造を解析する必要のある副生成物が 2 種類形成されました。

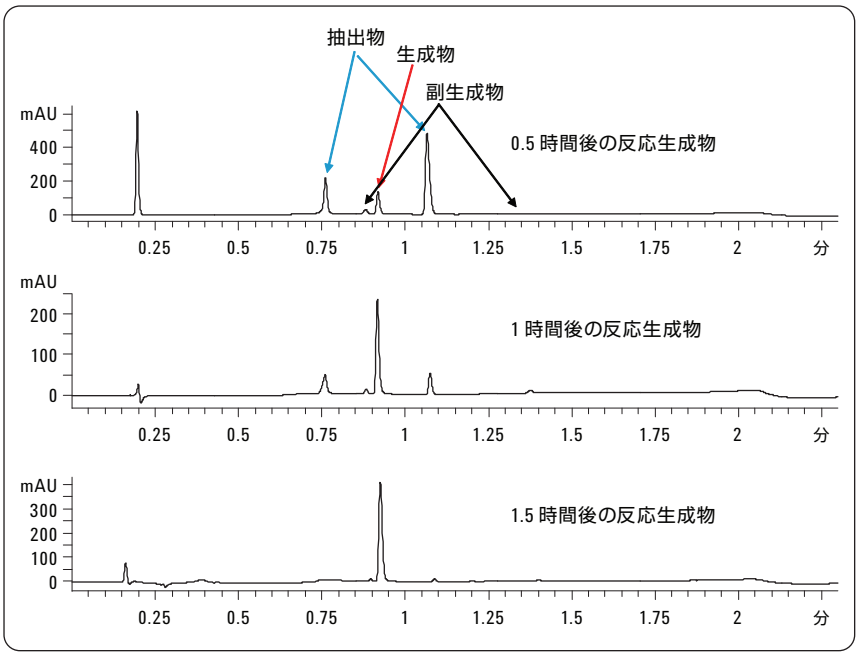


図 7
反応過程の確認

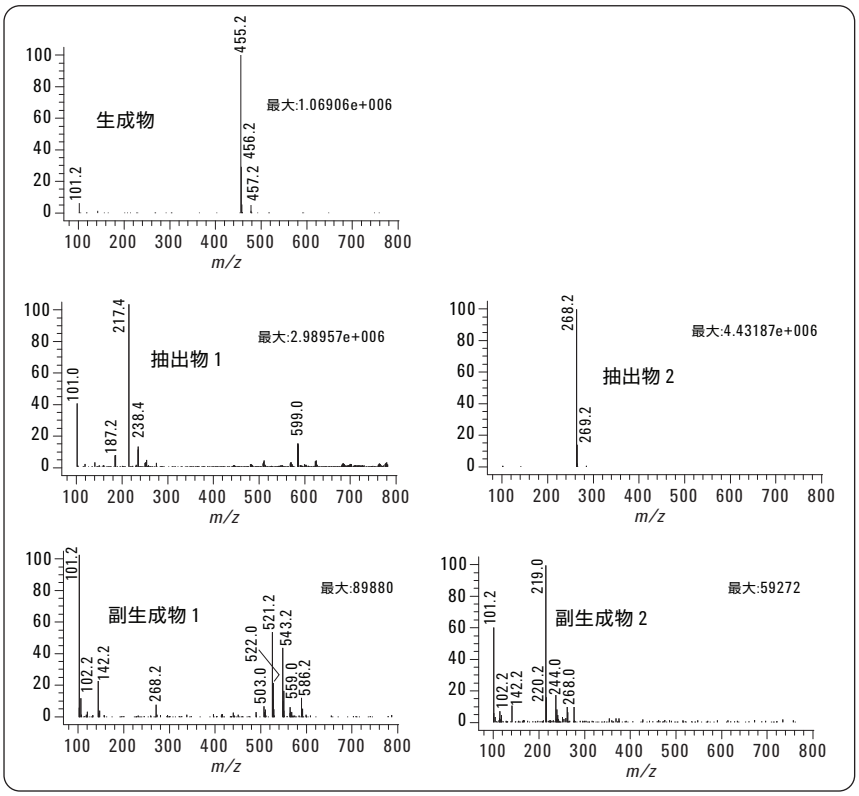


図 8
提出サンプルの質量スペクトル

グループ 3 が反応生成物をコントロールするためのサンプルを提出

LC/MS システムへのアクセス権を持つグループ 3 は、2 つの化合物の反応生成物をサンプルとして提出しています。この結果得られたクロマトグラムでは、メインピークの分解能が非常に低くなっています。反応生成物の情報を得るために LC/MS 分析が実行されました。図 9 には、3 つまたは 4 つのメインピークと 4 つの小さなピークのある UV クロマトグラムが示されています。また、メインピークに関する MS (スキャンモード) トータルイオンクロマトグラム (TIC) と抽出イオンクロマトグラム (EIC) も示されています。目的の生成物 (質量 450.4、リテンションタイム 1.087 分) は 2 時間後に形成されています。

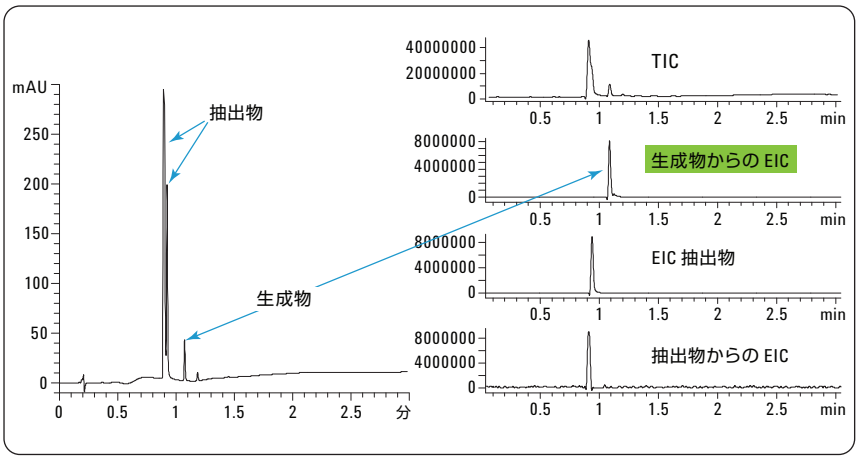


図 9.
特定の反応混合物の UV クロマトグラム/TIC/EIC

反応過程がやや遅いように見えます。つまり、温度などの反応パラメータが適切でなかったということです。このため、目的の生成物の収率が低くなっています。

結論

分析および分取 LC/MS システムのある環境を自由に利用できるようにすれば、最短時間で分析結果を得ることができるようになり、化学者の生産性が飛躍的に高まります。これにより、化学者は、離れた場所にある分析ラボから結果報告が返ってくるのを待つ必要がなくなり、各自のワークフローに従って次々に作業を進めてゆくことができます。

Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューションと Agilent Easy Access ソフトウェアを組み合わせて用いることによって、このシステムで使用するカラムや溶媒を複数のカラムや溶媒から選択できるようにすれば、さらに化学者のニーズに合ったシステムにすることができ、化学者の生産性をさらに高めることができます。ユーザーグループごとに、選択性や分離効率の異なるカラムを最大 8 本までセットアップすることができ、ハードウェアを変更せずに常に化合物の特性や分析タスクに合ったカラムの使用が可能になります。

これにより、カラムの探索、反応のモニタリング、分取精製後の純度チェックにとって優れた条件が整います。このシステムには、UV や質量分析計をはじめとした各種検出器をつなげることができます。Easy Access ソフトウェアの使用により、サンプルごとに優先順位を設定でき、サンプルの分析を論理的な作業手順やスケジュールに合わせて実行できます。結果報告は E メールを介して行うことができます。

参考文献

1.
A.G. Huesgen, 「Agilent 1200 シリーズ LC メソッド開発ソリューション：最大 8 つのカラムを用いた自動メソッド開発」、資料番号 5989-9338JAJP, **2008**

2.
W. Duncan, D. McIntyre, "Increasing productivity with LC/MS Easy Access software." Agilent Technical Note 5988-5525EN, **2002**

3.
D. McIntyre, "Continuous Operation of a High Throughput LC/MS System in a Walk Up Environment." Agilent Technical Note 5989-6714EN, **2007**

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published February 1, 2009
Publication Number 5990-3358JAJP

Agilent Technologies